ژنتیک نوین
دوره پانزدهم ، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹
صفحه ۹۲ - ۷۵

ویرایش هدف‌دار ژنوم با میانجی‌گری اندونوکلئازهای مهندسی شده

An overview of genome editing methods based on endonucleases

منا بردبار[۱]، رضا درویش‌زاده[۲]، مقصود پژوهنده[۳]، دانیال کهریزی[*٤]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

۲- استاد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه و پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

٤- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه رازی

Bordbar M[1], Darvishzadeh R[2], Pazhouhandeh M[3], Kahrizi D[*4]

1- MSc, in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran
3- Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Azarbaijan Shahid Madani University, Iran
4- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Razi University, Kermanshah, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: dkahrizi@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۸/٦/۵ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۷/۱۵)

چکیده

برای مقابله با چالش‌های فعلی در کشاورزی، ویرایش ژنوم با استفاده از نوکلئازهای اختصاصی محل (SSNs) به‌عنوان یک ابزار قدرتمند برای تحقیقات زیست‌شناسی پایه و کاربردی ارائه شده است. در این مقاله، اصول و کاربرد ابزارهای ویرایش ژنوم، از جمله مگانوکلئازها (MN)، نوکلئازهای انگشت روی (ZFNs)، نوکلئازهای افکتور شبه فعال‌کننده‌ی رونویسی (TALENs) و تناوب‌های کوتاه پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای CRISPR/Cas9 توصیف می‌شود. در این میان؛ CRISPR/Cas9، به‌عنوان جدیدترین فناوری ویرایش ژنوم، به سرعت در حال توسعه است و با موفقیت در بسیاری از ارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. این مقاله به‌طور خاص قدرت CRISPR/Cas9 را به‌عنوان ابزاری برای مهندسی ژنوم گیاهی نشان می‌دهد و نقاط قوت و ضعف فن‌آوری CRISPR/Cas9 را در مقایسه با سه ابزار ویرایش مجدد ژنوم، MNs، ZFNs و TALEN تشریح می‌نماید.

واژه‌های کلیدی

اندونوکلئاز
ویرایش ژن
CRISPR/Cas9

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.6.9]

مقدمه

در اصلاح نباتات متداول، ایجاد تغییر در ساختار ژنتیکی گیاهان عمدتاً توسط روش‌های معمول شامل دورگ‌گیری و گزینش، تلاقی‌های برگشتی و جهش انجام می‌گیرد. کاهش تنوع زیستی، نیاز به وجود گونه‌های خویشاوند و سازگار جنسی گیاه هدف، لزوم صرف هزینه بالا و زمان‌بربودن فرآیندهای اصلاحی از ایرادهای اساسی اصلاح نباتات متداول است (Chen and Gao 2014).

نتیجه پیشرفت‌ها در زیست‌شناسی مولکولی ظهور فناوری‌های نوین مانند بیوتکنولوژی و نانوبیوتکنولوژی است. مهندسی ژنتیک یکی از فناوری‌های نوین و ارزشمندی است که می‌تواند در خدمت بشریت قرار گیرد (Dumbliauskas et al. 2011). این فناوری از ابتدای پیدایش، یعنی دهه هفتم قرن بیستم، تاکنون پیشرفت‌های چشم‌گیری داشته و خدمات ارزنده‌ای را ارائه نموده است (Pazhouhandeh et al. 2006). ویرایش هدفمند ژنوم با استفاده از نوکلئازهای اختصاصی، پتانسیل بالایی را برای بهبود کیفیت و عملکرد گیاهان زراعی در جهت تامین نیاز غذایی مردم جهان و فراهم کردن یک سیستم کشاورزی پایدار ایجاد کرده است (Lio et al. 2013; Pakbaz et al. 2015).

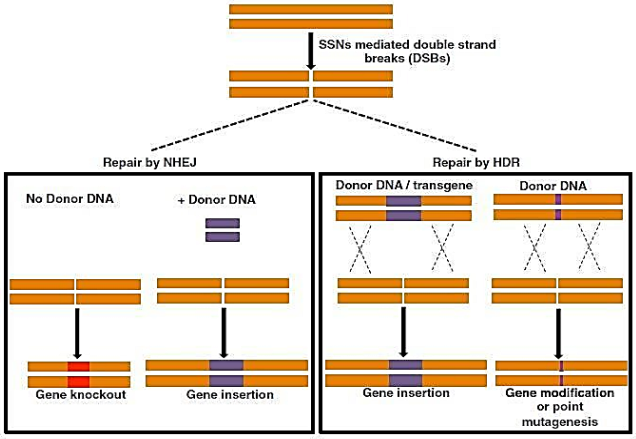
امروزه تولید غذا هم از ابعاد کمی و کیفی نمی‌تواند صرفاً به کشاورزی سنتی متکی باشد. تأمین امنیت غذایی جامعه و نیاز به افزایش مداوم تولیدات کشاورزی بستگی به مسلح شدن و در آمیختن مؤثر اصلاح نباتات متداول با زیست‌فناوری‌های نوین و ابزارهای قوی مهندسی ژنتیک دارد. اگرچه، زیست‌فناوری‌های نوین روش‌هایی را برای تولید محصولاتی که کاربردهای گسترده‌ای در پزشکی، کشاورزی و صنعت دارند، فراهم می‌نمایند ولی جنبه‌های ایمنی موجودات دستورزی شده ژنتیکی[1] یا تراریخته[2] و فرآورده‌های حاصل از آن‌ها باید قبل از استفاده دقیقاً مورد بررسی قرار گیرند. از مهم‌ترین ملاحظات تاثیرگذار در بهره‌برداری از محصولات تراریخته، انتقال قطعات DNA غیر گیاهی به ژنوم گیاه والد، فرار ژن و انتقال عمودی ژن هدف و استفاده از ژن‌های گزینشگر مانند ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و علف‌کش‌ها می‌باشند (Jouzani et al. 2010; Jouzani and Tohidfar 2013; Tohidfar 2013). بنابراین، به عنوان یک جایگزین، نیاز به استفاده از روش‌های پیشرفته تولید گیاهان تراریخته مانند تناوب‌های کوتاه پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای Cas9[3] (CRISPR/Cas9) که نوعی روش ویرایش ژنوم است، جهت بهبود کیفیت و عملکرد موثر گیاهان زراعی با کارایی بالا بیش از پیش احساس می‌شود. این سیستم با ایجاد جهش‌هایی در مکان‌های ژنی چندگانه و ایجاد حذف‌های بزرگ می‌تواند به اصلاح گیاهان بدون انتقال ژن خارجی شتاب دهد. این روش می‌تواند عملکرد و فعالیت ژن‌های گیاهی را بهبود بخشیده و صفات جدید ایجاد نماید (Zhang and Zhou 2014). انواع متنوعی از نوکلئازهای اختصاصی محل[4] برای مهندسی ژنتیک استفاده می‌شوند. با اینکه جزئیات هر سیستم متفاوت است اما فرایند کلی سیستم‌های SSNs مشابه است (Samanta et al. 2016). مهم‌ترین بخشِ استراتژیِ مهندسیِ هدف‌دارِ ژنوم، ایجاد برش‌های دو رشته‌ایِ اختصاصی جایگاه در یک لوکوس از پیش تعیین شده به وسیله‌ی اندونوکلئازهای مهندسی شده است. ترمیم نهایی این برش‌های دو رشته‌ای، به وسیله ی نوترکیبی هومولوگی یا اتصال پایانه‌های غیر هومولوگ، تغییرات ژنتیکی مورد نظر و دلخواه را ایجاد می‌کند (Jensen et al. 2011; Perez-Pinera et al. 2012). سازوکار اتصال پایانه‌های غیرهومولوگ، به دلیل واردشدگی‌ها یا حذف‌های کوچک[5]، می‌تواند سبب تخریب ژن از طریق ایجاد جهش‌های تغییر در چارچوب[6] شود. بنابراین در تحقیقات، از این سیستم غالباً برای ایجاد موتاسیون و غیرفعال-سازی ژن استفاده می‌شود. در حالی که سازوکار نوترکیبی هومولوگ می‌تواند تبادل نوکلئوتیدی بین یک ناحیه‌ی ژنومی درونی و یک قطعه DNAی بیگانه را که توسط توالی‌های هومولوگ احاطه شده، واسطه‌گری نماید تا سبب واردشدگی، حذف و یا جایگزینی یک توالی خاص شود (Pauwels et al. 2014)، بنابراین از این مسیر عمدتاً برای حذف یا افزودن دقیق

[1] GMO: Genetically modified organism
[2] Transgenic

[3] CRISPR/Cas9: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/CRISPR-associated system 9.
[4] SSNs: Genome editing mediated by site- specific nucleases
[5] Indel
[6] Frame shift mutation

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.6.9]

بخش‌های هدف ژنوم و یا وارد کردن دقیق ژن خارجی به یک محل شناخته شده در ژنوم استفاده می‌شود (Maruyama et al. 2015). در نتیجه ویرایش ژنومی توسط SSNs می‌تواند بسیار متفاوت باشد (Samanta et al. 2016) (شکل ۱).



شکل ۱- نتایج محتمل حاصل از ویرایش ژنوم با استفاده از SSNs. بعد از شکسته شدن رشته دوتایی توسط SSNs ممکن است در غیاب رشته دهنده نتیجه به سمت خاموش کردن ژن منتهی شود یا در صورت حضور DNA دهنده ادغام ژن صورت پذیرد و با ترمیم انتهای غیر هومولوگ بازسازی انجام گیرد. نتیجه ترمیم شکست رشته دوتایی با مسیر هومولوگ ممکن است ایجاد جهش و یا ادغام ژن مورد نظر باشد (Marraffini and Jiang 2015).

برای اینکه یک اندونوکلئاز مهندسی شده، بتواند به طور گسترده‌ای در ویرایش هدف‌دار ژنوم کاربرد داشته باشد، باید دارای دو ویژگی اساسی باشد: الف) توالی بلندی از DNA را با ویژگی بالا شناسایی کند تا از ایجاد سمیت ناشی از برش‌های خارج از جایگاه هدف[1] جلوگیری شود. زیرا برش‌های خارج از جایگاه هدف، سبب ایجاد تغییرات در لوکوس‌های ناخواسته شده و فنوتیپ‌های غیر قابل پیش‌بینی می‌شود. ب) شناسایی و برش در یک توالی تعریف شده به آسانی عملی شود (Asadollahi et al. 2014). چهار رده اصلی از داکسی اندونوکلئازها، شامل مگانوکلئازها، اندونوکلئازهای انگشت روی، اندونوکلئازهای افکتور شبه فعال کننده‌ی رونویسی و سیستم CRISPR/Cas هستند که به‌عنوان ابزار مهندسی ژنوم توسعه یافته محسوب می‌شوند و هر کدام دارای معایب و مزایایی می‌باشند. در این مقاله سعی می شود که هر کدام از آن‌ها با توجه به میزان اهمیت و کارایی آن‌ها در مهندسی هدف‌دار ژنوم مورد بررسی و توصیف قرار گیرد.

۱- مگانوکلئازها (Meganucleases)

مگانوکلئازها که در تمام قلمروهای حیات یافت می‌شوند، نوکلئازهای طبیعی هستند که در اواخر دهه ۱۹۸۰ کشف شدند. این‌ها توالی‌های بلندی از DNA به طول ۴۰-۱۴ جفت‌باز را شناسایی می‌کنند و یک ابزار نویدبخش برای ایجاد برش‌های دو رشته‌ای در کروموزوم‌ها برای مهندسی هدف‌دار ژنوم هستند (Marraffini and Jiang 2015). مگانوکلئازها بر اساس توالی و موتیف‌های ساختاری به پنج خانواده تقسیم می‌شوند که بیشترین مطالعات بر روی اعضای خانواده‌ی LAGLIDADG به جهت آن که بیشترین ویژگی را در شناسایی توالی‌های DNA نشان داده‌اند (Zhao et al. 2007; Marcaida et al. 2010)، انجام گرفته است. ژن‌های کدکننده مگانوکلئازهای LAGLIDADG که تحت عنوان "نوکلئازهای خانگی"[2] نیز خوانده می‌شوند، بیشتر در درون اینترون‌ها واقع شده و تا امروز نقش دقیق آن‌ها در میزبان مشخص نشده و جزو عناصر ژنتیک خودخواه[3] دسته‌بندی می‌شوند (Gogarten and Hilario 2006). نام‌گذاری HEs مشابه نامگذاری آنزیم‌های برشی می‌باشد (Smith and Nathans 1973). در حقیقت اندونوکلئازهای اینترون با پیشوند I (برای intron) و اندونوکلئازهای intien با پیشوند PI (برای Protein insert) مشخص می‌شوند (Miglani 2017). دو مورد از مهم‌ترین اعضای این خانواده I-CreI (Heath 1997) گرفته شده از میتوکندری مخمر نان[4] و PI-SceI (Duan 1997) گرفته شده از کلروپلاست جلبک سبز[5] می‌باشند (Miglani 2017) که هر دو به‌صورت ساختار ثانویه‌ی صفحه‌ی آنتی پارالل- بتا در می‌آیند که به‌عنوان واحد شناسایی DNA عمل کرده و با تشکیل یک ساختار زین مانند بر روی شیار بزرگ مارپیچ DNA قرار می‌گیرند. برش DNA با میانجی‌گری کاتیون‌های دو ظرفیتی که در جایگاه فعال آنزیم واقع شده‌اند، کاتالیز می‌شود (Pauwels et al. 2014; Zhao et al. 2017).

[1] Off-target

[2] HE: Homing endonuclease
[3] Selfish
[4] *Saccharomyces cerevisiae*
[5] *Chlamydomonas reinhardti*

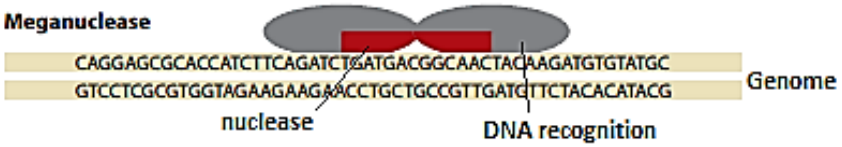
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.6.9]

برخی از مگانوکلئازها همودایمر تشکیل می‌دهند (مثل I-CreI) و جایگاه‌های هدف پالیندرومی[1] و پالیندرومی کاذب را شناسایی می‌کنند. در حالی که برخی دیگر از آن‌ها مونومری بوده (مانند I-SceI) و توالی‌های غیرپالیندرومی را شناسایی می‌کنند (Miglani 2017) (شکل ۲). مگانوکلئازها با وجود دارا بودن مزایایی قابل توجه مانند ویژگی بسیار بالا در شناسایی توالی مورد نظر، سه محدودیت اصلی نیز دارند که کاربرد وسیع آن‌ها را محدود می‌کند: الف) وجود شبکه گسترده‌ای از برهمکنش‌های بین DNA و مگانوکلئاز است که تاکنون کد آن شناسایی نشده است. ب) متیله شدن DNA در توالی‌های دو نوکلئوتیدی G و C سبب کاهش تمایل[2] آنزیم در اتصال به DNA و همچنین کاهش فعالیت کاتالیتیکی آنزیم می‌شود (Duan et al. 1997; Valton 2012). ج) احتمال وجود یک جایگاه شناسایی در ژنوم برای هر آنزیم بسیار پایین است. برای نمونه اگر طول جایگاه شناسایی یک آنزیم حدود ۱۸ جفت‌باز باشد، ژنوم انسان باید ۲۰ برابر بزرگ‌تر از مقدار فعلی باشد تا یک جایگاه شناسایی برای آنزیم مورد نظر وجود داشته باشد. برای ایجاد مگانوکلئازهای مهندسی شده، دو رویکرد ذیل مورد تاکید قرار گرفته است:

الف) تغییر ویژگی مگانوکلئازهای طبیعی از طریق تغییر توالی اسید آمینه‌ای آن‌ها و سپس انتخاب آنزیم‌های عملکردی که جایگاه مورد نظر را شناسایی کرده و برش دهند (Seligman et al. 2002; Rosen et al. 2006). ب) ادغام قلمروهای پروتئین‌های متفاوت و ایجاد پروتئین‌های شیمری[3] با توالی شناسایی جدید (Rosen et al. 2006; Arnould 2006). از مگانوکلئازها به‌طور وسیعی برای هدف‌گیری ژن‌ها در انواع سلول‌ها و ارگانیسم‌های متفاوت استفاده شده است. مگانوکلئاز I-CreI، اولین اندونوکلئازی بوده که به‌طور موفقیت‌آمیزی یک توالی تعریف شده در ژنوم انسان را به‌طور اختصاصی هدف قرار داده است. واریانت‌های مختلفی از I-CreI طراحی شده‌اند که ژن‌های مختلفی، از جمله ژن RAG1[4] که جهش در آن سبب بیماری ژنتیکی نقص ایمنی مرکب شدید[5] می‌شود (Muñoz et al. 2011; Smith et al. 2006)، و ژن XP[6] که سبب اگزودرما پیگمنتزوم می‌شود (Redondo et al. 2008)، را مورد هدف قرار می‌دهند. در مطالعه‌ای که بر روی میوبلاست‌های افراد مبتلا به دیستروفی عضلانی دوشن[7] و با استفاده از مگانوکلئازهای مهندسی شده، صورت گرفت، توانستند ژن دیستروفی را که در اگزون‌های ۵۲-۴۵ دچار حذف شده بود تصحیح نمایند (Popplewell 2013). نمونه‌هایی از کاربرد مگانوکلئازها در ویرایش ژنوم گیاهان در جدول ۱ آمده است.

[1] Palindromic
[2] Affinity

[3] Chimeric
[4] Recombination activating gene 1
[5] SCID: *Severe combined immunodeficiency*
[6] *Xeroderma pigmentosum*
[7] DMD: *Duchenne muscular dystrophy*

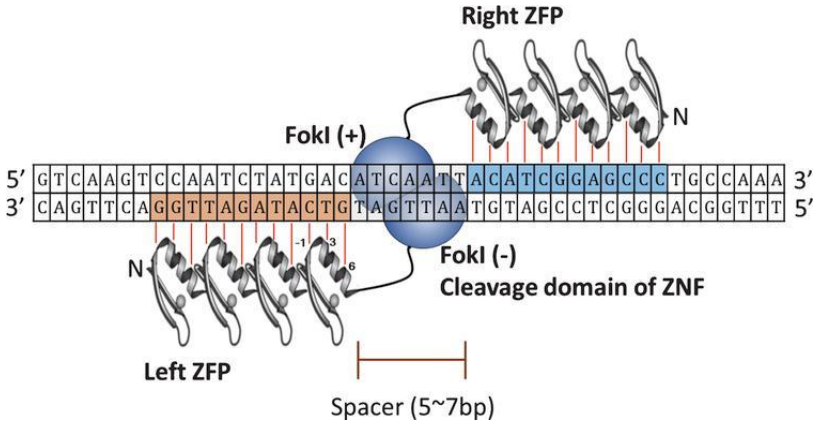


شکل ۲- شمای کلی طرز عمل مگانوکلئاز متصل شده به DNA دو رشته‌ای

جدول ۱- مواردی از کاربرد مگانوکلئازها در ویرایش ژنوم گیاهان

Homing endonuclease	گیاه	منبع
PB1	*Arabidopsis thaliana* (Thale cress)	Puchta (2002); Antunes et al. (2012)
I-SceI	*Hordeum vulgare* (Barley)	Watanabe et al. (2015)
	Nicotiana benthamiana (Tobacco)	Puchta, Dujon, and Hohn (1993); Puchta, Dujon, and Hohn (1996); Puchta (1999b); Siebert and Puchta (2002)
	Zea mays (Maize)	Yang et al. (2009); Gao et al. (2010)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.6.9]



شکل ۳- تصویر دایمر نوکلئاز انگشت‌روی متصل به قطعه DNA هدف خود. القای شکستگی در رشته دوتایی نیازمند یک جفت ZFNs، که هر یک شامل ۳ الی ٦ پروتئین انگشت‌روی (که دراین شکل ٤ تا از آن‌ها نشان داده شده) در انتهای N-terminal و دمین شکافنده اندونوکلئاز محدودگر Fok1 در انتهای C-terminal می‌باشد. حدود ۳٦-۱۸ نوکلئوتید توسط دایمر ZFN شناسایی شده، و آنزیم Fok1 موجب شکست در دو رشتهDNA در توالی هدف می‌شود. دو توالی شناسایی ZFN توسط توالی ۷-۵ نوکلئوتیدی جداگر از یکدیگر جدا می‌شوند (Marraffini and Jiang 2015).

۲- نوکلئازهای انگشت روی (Zinc-finger nucleases)

پروتئین‌های انگشت روی، پروتئین‌های مصنوعی هستند که با ادغام چندین قلمرو از رده عامل‌های رونویسی تحت عنوان پروتئین‌های انگشت روی به یک قلمرو برش‌دهنده‌ی مستقل از توالی مربوط به اندونوکلئاز محدودکننده نوع IIS از FokI ساخته شده‌اند. هر قلمرو انگشت روی، شامل ۳۰ اسیدآمینه است که دارای یک اتم روی می‌باشند که با دو اسیدآمینه هیستیدین و دو اسیدآمینه سیستئین پیوند غیرکوالان برقرار می‌کنند (Noori-Daloii 2010; Miller 1985; Wolfe 2000). یک مارپیچ آلفا در هر قلمرو انگشت روی، یک توالی سه‌تایی اختصاصی از DNA را شناسایی می‌کند. در مطالعات اولیه مشخص شد هر ZFN مورد استفاده تنها سه قلمرو انگشت روی داشته که به توالی ۹ جفت‌بازی از DNA متصل می‌شود. به‌طوری که دایمرهای ZFN (گونه‌های فعال) را قادر می‌سازد که یک توالی ۱۸ جفت‌بازی را برای هر برش شناسایی کنند (Urnov 2010). به‌دلیل اینکه قلمرو نوکلئاز FokI به‌صورت دایمر عمل می‌کند، نوکلئازهای عملکردی انگشت روی زمانی شکل می‌گیرند که قلمروهای انگشت روی در نزدیکی همدیگر قرار گیرند و همچنین دارای جهت‌گیری مناسبی باشند؛ طوری‌که قلمروهای کاتالیتیک آنزیم FokI در کنار هم قرار گیرند (Urnov 2010; Vanamee et al. 2001). دو واحد مونومری ZFN به نزدیکی ناحیه ژن هدف متصل می‌شوند و رشته‌ها را از هم جدا کرده تا فاصله‌ی مناسبی برای ایجاد DSB[1] در ژنوم ایجاد شود چون در غیر این صورت تشکیل دایمر اندونوکلئاز FokI غیر ممکن می‌شود (Vanamee et al. 2001) (شکل ۳).

برای به حداقل رساندن برش‌های ناخواسته، تغییرات متنوعی را می‌توان در مورد ZFNها اعمال کرد: الف) نوکلئازهای انگشت روی را طوری می‌توان طراحی کرد که تنها به‌صورت هترودایمر عمل کنند. برای نیل به این هدف، واریانت‌هایی را در قلمرو کاتالیتیک آنزیم Fok1 ایجاد می‌کنند که تنها ساختارهای هترودایمر تشکیل شوند و همودایمرها ناپایدار باشند (Bitinaite et al. 1998; Geurts and Moreno 2010). ب) طول فاصله‌انداز[2] بین دو مونومر ZFN معمولاً حدود ٦-٤ جفت‌باز است، اما از طریق ایجاد تغییرات در طول رابط[3] بین ZFP و Fok1 نیز می‌توان توان تا حدی از دایمریزاسیون غیر اختصاصی و در نتیجه برش‌های خارج از جایگاه هدف جلوگیری کرد (Noori-Daloii 2010; Shimizu et al. 2009; Händel et al. 2009). ج) یکی دیگر از تغییرات ایجاد شده در ZFNها، افزایش فعالیت کاتالیتیک قلمرو Fok1 می‌باشد که نتیجه آن ایجاد واریانت‌هایی با فعالیت افزایش یافته است (Gao et al. 2010). د) طراحی نیکازهای

[1] Double-strand break
[2] Spacer
[3] Linker

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.6.9]

انگشت‌روی[1] از طریق ایجاد واریانت‌هایی در قلمرو کاتالیک Fok1 یکی از مونومرها، به‌طوری که فعالیت اندونوکلئازی آنزیم از دست رفته، اما تاثیری بر فرآیند دایمریزاسیون نداشته باشد. در نتیجه، پس از دایمریزاسیون تنها یکی از رشته‌های DNA برش خورده و به اصطلاح یک Nick ایجاد می‌شود که برای ترمیم آن، سلول بیشتر از سازوکار نوترکیبی هومولوگ استفاده می‌کند (Meng et al. 2008). نوکلئازهای انگشت‌روی در مقایسه با مگانوکلئازها به‌دلیل دارا بودن ویژگی Modularity طراحی آسان‌تری دارند.

هرچند که نوکلئازهای انگشت‌روی برای ویرایش هدف‌دار ژنوم در طیف متنوعی از سلول‌ها و ارگانیسم‌ها استفاده شده‌اند (Urnov et al. 2010)، اما دو محدودیت اصلی، کاربرد گسترده‌ی آن‌ها را محدود کرده است: الف) قلمروهای انگشت‌روی به‌دلیل اثرات Context-dependent DNA binding ظرفیت محدودی دارند که هدف قرار دادن هر توالی مورد نظر از DNA را برای نوکلئازهای انگشت‌روی دشوار می‌کند (Ramirez et al. 2008). ب) فقدان برخی ویژگی‌های قلمروهای انگشت‌روی، می‌تواند برش‌هایی را در جایگاه‌های غیرهدف ایجاد کند که سبب جهش‌های ناخواسته و در نتیجه ایجاد فنوتیپ‌های غیر قابل پیش بینی و یا به عبارتی، سبب میزان سمیت بالایی شوند (Pattanayak et al. 2011; Marraffini and Jiang 2015).

اولین موفقیت استفاده از ZFN ایجاد جهش در ژن زردی دروزوفیلا (Bibikova et al. 2002) در حدود یک دهه پیش بود و تاکنون در مورد بسیاری از سلول‌ها و جانداران مورد استفاده قرار گرفته است. به‌طور مثال در زیگوت ماهی زبرا به‌طور مستقیم در سال ۲۰۰۸، در زیگوت خانواده موش‌ها در سال ۲۰۱۰ (Carbery et al. 2010; Cui et al. 2011; Meyeret al. 2010)، برای درمان بیماری‌ها از قبیل ایجاد اختلال در بیان ژن CCR5[2] در انسان به‌منظور ایجاد مقاومت به ویروس HIV[3] و نهایتا حفاظت از سلول‌های ایمنی بدن و درمان HIV (Holt et al. 2010) در بسیاری از گیاهان، از روش ویرایش ژنوم به‌وسیله‌ی ZFNsهای مهندسی شده استفاده شده است که جزئیات در جدول ۲ آورده شده است.

۳- نوکلئازهای افکتور شبه فعال‌کننده رونویسی[4] (TALEN)

اخیرا نوکلئازهای اِفکتور شبه فعال کننده‌ی رونویسی TALENs که در سال ۲۰۱۰ به‌وسیله Christian و همکاران گزارش شد به‌عنوان یک ابزار دیگر در ویرایش ژنوم مطرح شده‌اند (Joung and Sander 2013). فاکتورهای شبه‌فعال کننده رونویسی، پروتئین‌هایی هستند که به‌طور طبیعی از باکتری‌های خانواده زانتوموناس ترشح می‌شوند و به توالی‌هایی در ژنوم گیاهان میزبان اتصال می‌یابند. مشابه با نوکلئازهای انگشت‌روی، نوکلئازهای افکتور شبه‌فعال‌کننده‌ی رونویسی هم، قلمرو غیر اختصاصی Fok1 را به‌عنوان واحد برش دهنده‌ی DNA مورد استفاده قرار می‌دهند و به‌صورت دایمر عمل می‌کنند. هر تکرار ۳۵-۳۳ اسیدآمینه را شامل می‌شود و یک نوکلئوتید را شناسایی می‌کند. آخرین تکرار معمولاً تنها ۲۰ اسیدآمینه دارد. به‌همین دلیل یک نیم-تکرار[5] نامیده می‌شود. ویژگی شناسایی DNA با میانجی‌گری اسیدآمینه‌های شدیداً متنوع در موقعیت‌های ۱۲ و ۱۳ هر تکرار انجام می‌گیرد (شکل ٤).

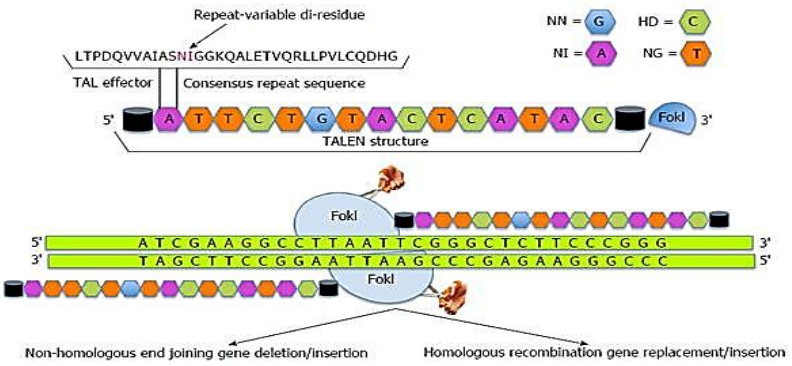
[1] ZF Nickases

[2] C-C chemokine receptor type 5
[3] Human immunodeficiency viruses
[4] TALEN: Transcription activator-like effector nucleases
[5] Half-repeat

جدول ۲- نمونه‌هایی از کاربرد ZFNsهای مهندسی شده در ویرایش ژنوم گونه‌ها و سلول‌های گیاهی

گیاه	منبع
Arabidopsis thaliana (Thale cress)	Lloyd et al. (2005); Wright et al. (2005); De Pater et al. (2009); Osakabe, Osakabe, and Toki (2010); Zhang et al. (2010)
Glycine max (Soybean)	Curtin et al. (2011); Sander et al. (2011)
Nicotiana sp. (Tobacco)	Wright et al. (2005); Townsend et al. (2009); Cai et al. (2009); Petolino et al. (2010); Schneider et al. (2016)
Petunia disambiguation (Petunia)	Marton et al. (2010)
Zea mays (Maize)	Ainley et al. (2013); Kumar et al. (2015)
Other plants	De Pater et al. (2009); Marton et al. (2010); Peer et al. (2015)
Plant cells	Cai et al. (2009)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.6.9]



شکل ٤- تصویر نوکلئاز TALENجفت شده با توالی DNA هدف خود. هر توالی TALEN دارای افکتورهای شبه فعال کننده رونویسی در انتهای N-terminal (TALEs) و دومین شکافنده اندونوکلئاز FokI در انتهای C-terminal است. هر TALEs شامل ۲۰-۱۵ تکرار متغیر دو رزیدویی (RVDs) و هر RVDs یک جفت نوکلئوتید از توالی DNA هدف را شناسایی می‌کند. جفت‌های TALENحدوداً ٤٠-۳۰ جفت‌باز را روی DNA هدف شناسایی می‌کنند، و دو جفت از توالی هدف TALEN توسط ۲۱-۱۲ جفت‌باز از جداگر DNA از هم جدا می‌شوند (Marraffini and Jiang 2015).

برخلاف ZFNها که Context-dependent DNA binding رخ می‌داد و طراحی آن‌ها را با مشکل روبه‌رو می‌ساخت، این امر در مورد TALENها رخ نمی‌دهد و به آسانی و سریع برای هر توالی از DNA به‌دلیل کد ساده‌ی پروتئین-DNA ساخته می‌شوند. افزون بر این، نشان داده شده که TALENها به‌طور قابل توجهی، برش‌های غیر اختصاصی و سمّیت را در مقایسه با ZFNها کاهش می‌دهند، از این‌رو، ابزار سودمندتری برای ویرایش ژنوم به شمار می‌آیند (Ding et al. 2013). براساس آزمایش گزارشگر مخمر[1]، طول بهینه‌ی فاصله‌انداز بین دو جایگاه اتصالی TALEN حدود ۳۱-۱٦ جفت‌باز است (Sun and Zhao 2013). به‌دلیل این‌که قلمرو کاتالیتیک Fok1 برای فعال شدن باید دایمر شود، زیر واحدهای TALEN باید در جایگاه برش به‌صورت هترودایمر تجمع یابند. همودایمرهای TALEN استعداد بالایی در برش‌های غیراختصاصی دارند که سبب کاهش ایمنی و کارایی در ویرایش ژنوم می‌شوند. برای حل این مشکل در قلمرو کاتالیتیک TALENها جهش‌هایی را ایجاد می‌کنند که از طریق تداخل در برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک و هیدروفوب سبب جلوگیری از تشکیل همودایمر می‌شود. بنابراین، همه‌ی دایمرهای پایدار تشکیل‌شده در جایگاه اختصاصی برش از نوع هترو می‌باشند. ایجاد واریانت‌های Fok1 که به‌طور ترجیحی ایجاد هترودایمر می‌کنند، به طرز موفقیت‌آمیزی برش‌های غیراختصاصی را کاهش می‌دهند (Doyon et al. 2011; Miller et al. 2007). ویژگی شناسایی DNA به‌وسیله‌ی RVDها[2] در موقعیت‌های ۱۲ و ۱۳ از هر تکرار صورت می‌گیرد. بیش از ۲۰ نوع RVD مختلف در TALEها شناسایی شده که در این میانHG, NN, HD, NG, NI به مراتب رایج‌ترند و هرکدام به‌ترتیب نوکلئوتیدهای T, G/A, C, T, A را شناسایی می‌کنند (Boch et al. 2009; Moscou and Bogdanove 2009). هر واحد تکراری دارای دو هلیکس چپ‌گرد است که لوپ در برگیرنده‌ی RVD را در معرض شیار بزرگ DNA قرار می‌دهد (Deng et al. 2012; Mak et al. 2012). TALEN انعطاف‌پذیری و کارایی بیشتری نسبت به ZFN دارد ولی عیب آن مشکل بودن شناسایی نوکلئوتیدها و ٤-۳ بار بلندتربودن تکرارهای آن نسبت به ZFN است. شباهت تکرارهای TALEN و پیچیده و دشوار بودن جمع‌آوری و نگهداری آن‌ها در یک پلاسمید و کدگذاری آن‌ها در سلول‌های میزبان از دیگر معایب این تکنیک است. علاوه بر این تکرارهای پشت سرهم آن‌ها چالش بزرگی برای بسته‌بندی آن‌ها در وکتورهای آدنو وایرال و رترو وایرال است. اولین استفاده از TALEN در ویرایش ژن‌های NTF3 (Neurotrophin 3) و CCR5 در لاین‌های سلولی و شناسایی ۵ لوکوس در سلول‌های پایه جنینی انسان در سال ۲۰۱۱ بود. در این روش میزان جهش‌های Off-target کاهش یافته و سیتوتوکسیتی مرتبط با نوکلئازها کاهش می‌یابد.

[1] Yeast reporter assay

[2] Repeat-variable diresidues

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.6.9]

جدول ۳- نمونه‌هایی از کاربرد روش TALEN در ویرایش ژنوم گونه‌ها و سلول‌های گیاهی

گیاه/ سلول گیاهی	منبع
Arabidopsis thaliana (Thale cress)	Morbitzer et al. (2010)
Glycine max (Soybean)	Haun et al. (2014)
Nicotiana tabacum (Tobacco)	Zhang et al. (2013); Li et al. (2016)
Oryza sativa (Rice)	Nishizawa-Yokoi et al. (2015); Shan et al. (2015)
Solanum tuberosum (Potato)	Sawai et al. (2014); Clasen et al. (2016)
Zea mays (Maize)	Liang et al. (2014)
Hordeum vulgare (Barley) leaf cells	Budhagatapalli et al. (2015)
Nicotiana tabacum (Tobacco) protoplast-derived calli	Zhang et al. (2013)

تعدادی از گونه‌ها و سلول‌های گیاهی مختلفی که با این روش ویرایش ژنوم، مهندسی شده‌اند در جدول ۲ آورده شده است.

٤- سیستم CRISPR/Cas

کریسپر (CRISPR) اختصار یافته‌ی واژه‌ی Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats است که معنای لفظی آن تناوب‌های کوتاه پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای است. کریسپر بخشی از DNA پروکاریوت بوده که حاوی تناوب‌های کوتاه توالی‌های بنیادین است. کریسپر نوعی سیستم ایمنی تطابق‌پذیر در باکتری‌ها است که آن‌ها را قادر به کشف DNA ویروس کرده و بعد آنها را نابود می‌کند. بخشی از سیستم کریسپر، پروتئینی به نام Cas9 است که قابلیت جستجو، برش زدن و سرانجام استحاله‌ی DNA ویروس را به روشی خاص دارد. این فناوری که با نام کریسپر (CRISPR) شناخته می‌شود، به دانشمندان امکان می‌دهد که بسیار دقیق‌تر و بهتر از همه روش‌های پیشین، هر ژنی را در هر موجود زنده‌ای ویرایش و تغییرات لازم را در آن اعمال کنند. به پروتئین‌های دخیل در این مکانیزم CRISPR associated proteins گفته می‌شود که نقش ایجاد کننده‌ی فاصله بین ژن‌های خاص را دارند. Cas می‌تواند توالی خاصی از یک ژن را شناسایی کرده و آن را برش دهد. Cas9 در واقع پروتئینی با عملکرد آنزیمی است که می‌توان با توجه به این که نقش برش توالی ویژه‌ای از DNA باکتریایی را برعهده دارد آن را نوکلئاز نامید.

مروری بر سازوکار سیستم CRISPR/Cas9

سیستم CRISPR/Cas برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ در ژنوم باکتری *Escherichia coli* به‌عنوان یک سیستم ایمنی اکتسابی در برابر هجوم باکتریوفاژها و ورود DNA خارجی مانند پلاسمیدها به درون سلول باکتری شناسایی شد و به دنبال آن در سال ۲۰۰۰ خانواده‌های ژنی CRISPR در تمام پروکاریوت‌ها شناسایی شد (Ishino et al. 1987; Mojica et al. 2000). کریسپرها در ٤٠ درصد از ژنوم باکتری‌های توالی‌یابی شده و در ۹۰ درصد از آرکی‌ها یافت می‌شوند (Grissa et al.2007). لوکوس CRISPR به‌عنوان بخشی از ژنوم باکتری دارای مجموعه‌ای از توالی‌های تکراری (تکرارهای مستقیم) است که به‌وسیله قطعات کوتاهی از توالی‌های غیرتکراری (Spacer) بین‌شان فاصله ایجاد شده است. طول توالی‌های تکراری در حدود ۵۰-۲۵ جفت‌باز و به تعداد بیش از ۲٤۹ عدد و ناحیه فاصله‌دهنده محتوی توالی‌های غیر تکراری در حدود ۷۲-۲٦ جفت باز است (Kim and Kim 2014). همچنین توالی رهبر به طول تقریبی ۵۰۰-۲۰۰ جفت‌باز از توالی‌های غنی از AT تشکیل شده که به‌عنوان یک توالی پیشبر برای نسخه‌برداری آرایه‌های مکان ژنی CRISPR ضروری است. ژن‌های CRISPR associated (Cas) به تعداد ٤ عدد (Cas ١-٤) در نزدیک ناحیه CRISPR array قرار گرفته‌اند که رمز کننده پروتئین‌های ضروری جهت القای پاسخ ایمنی توسط باکتری در برابر حمله ویروس هستند (Staals et al. 2013; Kim and Kim 2014). سه جزءکلیدی که در این سیستم نقش دارند شناسایی شده‌اند (Deveau et al. 2008):

1- CRISPR RNA (CrRNA)
2- Trans-activating RNA (tracrRNA)
3- آنزیم Cas

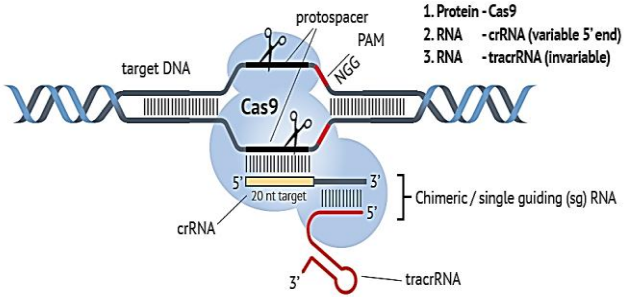
ویژگی حیاتی و ضروری دیگر Cas9، PAM[1] است. سیستم CRISPR/Cas9 می‌تواند برای هدف‌گیری هر ناحیه‌ای از ژنوم از طریق طراحی gRNA[2] مطلوب به‌کار رود. اما اختصاصیت این سیستم به توالی سه نوکلئوتیدی به‌نام PAM که درست قبل از

[1] Protospacer adjacent motif
[2] guide RNA

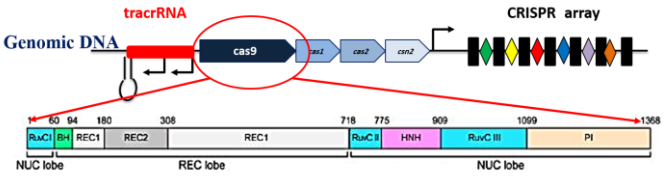
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.6.9]

توالی هدف قرار گرفته است بستگی دارد. در سیستم ایمنی باکتریایی و آرکئی دمین شناسایی کننده ناحیه PAM در Cas9 احتمالاً به‌عنوان وسیله‌ای برای شناسایی DNA خودی و مهاجم به کار رفته و مانع از این می‌شود که CRISPR ژنوم باکتری یا آرکئی را مورد هدف قرار دهد. توالی مورد شناسایی PAM که توسط آنزیم Cas9 شناسایی می‌شود بر اساس گونه و نوع باکتری که آنزیم نوکلئاز Cas9 از آن مشتق شده است، متفاوت می‌باشد. آنزیم نوکلئازی Cas9 باکتری *Streptococcus pyogenes* که جزء تیپ II کریسپری می‌باشد بیش از همه به‌منظور ویرایش ژنوم استفاده شده است. این نوکلئاز خاص، توالی 5′-NGG را روی DNA و در قسمت انتهای 3′ توالی gRNA شناسایی می‌کند.

نمای کلی از سیستم CRISPR/Cas9 در شکل ۵ نشان داده شده است. مطالعات اولیه نشان دادند که حداقل ۱۱ نوع سیستم CRISPR/Cas وجود دارند و تمام این سیستم‌ها در سه گروه عمده III, II, I تقسیم می‌شوند. نوع I و III حاوی انواع مختلف پروتئین Cas هستند که برای تسهیل شناسایی نوکلئیک اسیدهای هدف با CrRNA تشکیل یک کمپلکس را می‌دهند. اما در نوع II فقط از یک پروتئین Cas به‌نام نوکلئاز Cas9 استفاده می‌شود که به‌دلیل ساده بودن بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته و تبدیل به یک ابزار ژنومی مناسب جهت ویرایش شده است (Kumar and Jain 2014; Jiang and Marraffini 2015).



شکل ۵- تصویر نمایشی DNA هدف به‌همراه هدف‌گیری توسط sgRNA- guide یک sgRNA، دارای ۲۱ نوکلئوتید CrRNA spacer و دم tracrRNA، که آندونوکلئاز Cas9 را برای متصل شدن به محل مورد نظر راهنمایی کرده و پیچ و تاب حدود ۲۱ نوکلئوتید از محل مورد نظر بر روی ژنوم را باز می‌کند. محل هدف باید در چارچوب 50-N20-NGG باشد. ابتدا و انتهای رشته DNA ژنومی توسط دمین RUV و دمین HNH از Cas9 برای ایجاد شکستگی رشته دوتایی در نزدیکی PAM حدود سه جفت‌باز شکافته می‌شود (Deveau et al. 2008).



شکل ٦- ساختار پروتئین Cas9: کمپلکس غیرفعال Cas9 دارای ٦ دمین است که عبارتند از: ۱- دمین RECI به‌عنوان بزرگترین دمین پروتئین Cas9 است و در اتصال gRNA دخالت دارد. ۲- دمین RECII که فعالیت آن نامشخص است. ۳- دمین برهمکنش PAM که فعالیت این دمین در شناسایی توالی PAM و اتصال gRNA است. ٤- دمین Bridge-helix: که غنی از نوکلئوتیدهای گوانوزین است و در نگهداری gRNA و امکان ایجاد برش توسط دمین‌های HNH و RuvC را تسهیل کرده که نتیجه آن ایجاد هیبریداسیون بین gRNA و DNA هدف است. در هنگام ایجاد کمپلکس بین پروتئین Cas9 و gRNA کنفورماسیون دمین‌های RECII، HNH و RuvC تغییر کرده و کمپلکس فعال Cas9 را ایجاد می‌کنند. دمین‌های HNH و RuvC ٤-۳ نوکلئوتید در بالادست توالی PAM را برش می‌دهند.

سیستم CRISPR/Cas نوع II

کریسپر نوع II از همه ساده‌تر است و ابزارهای مولکولی آن شامل یک آنزیم تحت عنوان Cas9، به‌همراه دو قطعه RNA کوچک (crRNA) و (tracrRNA) می‌باشد (Kumar and Jain 2014; Deveau et al. 2008). Cas9 تنها ژن مورد نیاز برای بروز ایمنی نوع دوم CRISPR است (Sternberg et al. 2014). RNAهای کوچک دارای دو عملکرد داربستی و نشانه‌گیری هستند. بخشی که نقش نشانه‌گیری دارد دارای توالی مکمل بخشی از توالی ویروس‌های مهاجم پیشین هستند که موجب می‌گردند در دفعات بعدی مواجه میکروب با آن ویروس، سیستم کریسپر فعال شود؛ در نتیجه، با اتصال gRNA به توالی مکمل خود بر روی ژنوم ویروس مهاجم و قرارگیری آنزیم Cas9 در مجاورت آن، کمپلکس فعال شکل می‌گیرد و دمین‌های نوکلئازی این آنزیم فعالیت نوکلئازی را علیه ژنوم ویروس مهاجم انجام می‌دهند (Jiang et al. 2013; Szczelkun et al. 2014). در نتیجه، میکروب نسبت به ویروس مقاومت نشان می‌دهد این فعالیت آنزیمی موجب شکست در دو رشته (DSB: double-strand break) از ژنوم ویروس مهاجم می‌گردد و ویروس توانایی فعالیت خود را از دست می‌دهد (Gasiunas et al. 2012; Jinek et al. 2012). tracrRNA به‌عنوان یک کوفاکتور در شکافت DNA هدف به Cas9 عمل می‌کند

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.6.9]

(Brouns et al. 2008). آنزیم Cas9 از نظر ساختار و نحوه عملکرد نسبت به سایر نوکلئازهای کریسپری، پیچیدگی مولکولی کمتری دارد و به‌صورت تک زیر واحدی است. همین مسئله، موجب شده است که دانشمندان بتوانند از این آنزیم (که در سیستم نوع II کریسپر وجود دارد) به‌عنوان آنزیم نوکلئاز برای دستکاری ژنی بهره ببرند (Hsu et al. 20014; Wiedenheft et al. 2012; Cong et al. 2013; Mali et al. 2013; Jinek et al. 2012). به‌طور کلی سیستم طبیعی CRISPR/Cas از سه مرحله تشکیل شده است:

۱. مرحله انطباق: در مرحله ی اول توالی Protospacer از DNA مهاجم خارج شده و درون آرایه کریسپر[1] ذخیره می‌شود. در این راستا، ابتدا DNA خارجی به‌عنوان هدف برای کسب Spacer شناخته می‌شود. این عمل توسط کمپلکس Cas1-Cas2 که از دو دایمر Cas1 و یک دایمر Cas2 تشکیل شده انجام می‌شود. پس از شناسایی توالی Protospacer و شناسایی آن توسط کمپلکس Cas1-Cas2 این توالی به‌عنوان یک Spacer جدید به درون آرایه‌ی کریسپر جای داده شده و توالی تکراری نیز مضاعف می‌شود (Hsu et al. 2014; Rollie et al. 2015). بر اساس مطالعات انجام گرفته علاوه بر پروتئین‌های نوکلئازی Cas1 و Cas2، نوع دیگری از پروتئین Cas به نام Cas4 شناسایی شده است که با فعالیت اگزونوکلئازی در جهت ۵′ به ۳′ و با ایجاد 3′-Overhang امکان ادغام Protospacer به مکان ژنی CRISPR را فراهم می‌کند (Zhang et al. 2012).

۲. مرحله سنتز و پردازش: در مرحله بیان و بالغ سازی، آرایه‌ی کریسپر رونویسی شده و سپس به‌CrRNAهای بالغ پردازش می‌گردد که هر کدام حاوی یک توالی Spacer و قسمتی از توالی تکراری است. سپس CrRNA به‌همراه پروتئین Cas تشکیل یک ریبونوکلئوپروتئین را می‌دهد.

۳. مرحله تداخل[2]: در مرحله بعدی توالی tracrRNA که دارای یک ناحیه T شکل (۲۰ نوکلئوتیدی) و سه ناحیه حلقه است به ناحیه توالی تکراری CrRNA متصل شده و تشکیل یک دوپلکس CrRNA/tracrRNA به‌نام RNA راهنما (gRNA) می‌دهد. سپس بین gRNA و کمپلکس Cas9 بر همکنش ایجاد می‌شود (Jinek et al. 2012; Nishimasu et al. 2014). کمپلکس غیرفعال Cas9 دارای ٦ دمین است (شکل ٦). در واقع ۱۸-۱۲ جفت‌باز بالادست توالی PAM ناحیه Seed region نامیده می‌شود که بین توالیgRNA و DNA هدف هیبریداسیون ایجاد می‌شود. اختصاصیت این ناحیه در میزان کارایی سیستم CRISPR/Cas9 بسیار حائز اهمیت است. کمپلکس Cas9 با ایجاد برش‌های دورشته‌ای (DSBs) در DNA ژنومی باعث ایجاد ویرایش ژنوم در توالی ژن هدف می‌شود (Jinek et al. 2012; Nishimasu et al. 2014). برش DNA دو رشته‌ای در سلول یوکاریوتی از طریق دو سیستم ترمیمی NHEJ[3] و HDR[4] بازسازی می‌شود. روش اول که در مکانیسم‌های سلولی غالب‌تر بوده و در فاز G1 و G0 سلول اتفاق می‌افتد، معمولاً منجر به تولید indel کوتاه در توالی هدف می‌شود. به‌همین دلیل این روش برای ایجاد جهش‌های تغییردهنده‌ی توالی کد کننده پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش دوم HDR، معمولاً در فاز S و G2 فعال بوده و از توالی همولوگ حاضر در ژنوم سلول استفاده می‌کند. بنابراین می‌توان از آن برای مهندسی دقیق ژنوم و بازسازی نقص‌های ژنی استفاده کرد (Anders et al. 2014).

ویرایش هدفمند ژنوم جهت ایجاد تغییرات هدفمند در ژنوم مانند خاموشی ژن، جایگزینی ژن، ویرایش ژن‌ها، شناسایی عملکرد ژن و در تنظیم فرآیند نسخه‌برداری توسط RGENها[5] استفاده می‌شود. پس از ایجاد DSB، سازوکار بازسازی نوترکیبی همولوگ می‌تواند در بازه وسیعی از موجودات و انواع سلول‌ها تغییرات نوکلئوتیدی دلخواه را ایجاد نماید (Doudna and Charpentier 2014). این فناوری به‌عنوان یک فناوری نوپا و بدیع به‌دلیل طراحی ساده و استفاده آسان، پژوهش‌های ژنتیک و زیست‌شناسی مولکولی را تحت تاثیر قرار داده است. در حال حاضر انواع متنوعی از توالی gRNA در دسترس است که می‌تواند در شاخه بیوتکنولوژی گیاهی کاربردهای وسیعی داشته باشند (Khatodia 2016).

انواع کارآمدتر و دقیق‌تر سیستم CRISPR

[1] CRISPER array
[2] *Interference*
[3] *Non-homologous end joining*
[4] Homology-directed repair
[5] RNA-guided engineered nucleases

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.6.9]

مطالعات اخیر نشان داده است که اگرچه هر ۲۰ نوکلئوتید در توالی gRNA برای عملکرد اختصاصی و اتصال به هدف ضروری هستند اما وجود چند عدم تطبیق در این محل‌ها قابل تحمل است که این خود موجب ایجاد برش نابجا در ژنوم می‌شود (Cong et al. 2013; Jiang et al. 2013). برای جلوگیری از ایجاد برش دو رشته‌ای در جایگاه غیراختصاصی، نوع Cas9 نیکاز (Cas9n) معرفی شده است. همان‌طور که اشاره شد پروتئین Cas9 دو دمین برش دهنده دارد که هر یک در یکی از رشته‌های DNA ایجاد برش می‌کنند؛ بنابراین با غیرفعال نمودن هر یک از این دمین‌ها می‌توان به یک آنزیم با قابلیت ایجاد برش تک رشته‌ای دست یافت. این نوع موتان از Cas9، نیکاز نامیده شده است. در این حالت برای القا برش دو رشته‌ای نیاز به دو gRNA می‌باشد که هر یک به یکی از رشته‌ها متصل می‌شود به‌صورتی‌که ناحیه ′۵ این gRNAها به سمت هم بوده و فاصله بین این دو ′۵ (Offset) می‌تواند بین ۲۰-۰ جفت‌باز باشد. در این حالت برش با انتهای اضافه ′۵ در DNA هدف ایجاد می‌شود. این سیستم تحت عنوان Double nicking شناخته شده است. در این سیستم به‌صورت معمول از آنزیم نیکاز دارای جهش D10A در دمین RuvC استفاده می‌شود (Ran et al. 2013). اهمیت استفاده از فرم نیکاز آن است که در صورتی‌که هر یک از gRNAها به‌صورت غیراختصاصی به محلی متصل شده و در آن محل برش تک رشته‌ای ایجاد شود، سیستم تعمیری BER[1] آن را رفع می‌نماید و تنها برش دو رشته‌ای ایجاد شده در نتیجه اتصال دو gRNA در فاصله نزدیک به هم منجر به فعال شدن مسیرهای NHEJ و یا HDR می‌شود. لازم به ذکر است تاکنون روش مؤثری برای بررسی دقیق اثرات برش تک رشته‌ای معرفی نشده است. این سیستم به میزان قابل توجهی موجب کاهش برش نابه‌جا می‌شود اگرچه کارایی Cas9n در مقایسه با فرم وحشی پروتئین Cas9 نیز به میزان کمی کاهش می‌یابد (Mali et al. 2013).

در راستای بهبود سیستم نیکاز، محققین نوع دقیق‌تری از Cas9 را معرفی کردند که در آن هر دو دمین برش دهنده غیرفعال شدند. این نوع اصطلاحاً dCas9 نامیده شده است. در ادامه، اتصال دمین برش دهنده غیراختصاصی Fok1 به انتهای آمینوی dCas9 سیستم موسوم به RFN را ایجاد کرد. در این سیستم dCas9 به‌عنوان حامل و هدایت کننده Fok1 به جایگاه برش عمل می‌کند. اساس این سیستم مشابه Double nicking است با این تفاوت که فعالیت نوکلئازی Fok1 مستلزم دایمر شدن آن با همتای خود در رشته مقابل می‌باشد؛ بنابراین برخلاف سیستم نیکاز در RFN اتصال یک gRNA به تنهایی منجر به ایجاد برش تک رشته‌ای نخواهد شد. این سیستم نیز همانند Double nicking نیاز به طراحی دو gRNA که هر یک به یکی از رشته‌های DNA متصل می‌شوند، دارد. در این مورد نیز ′۵ این gRNAها باید به‌سمت یکدیگر بوده و فاصله کارآمد بین ′۵ gRNAها، ۱۷-۱۴ جفت‌باز می‌باشد (Tsai et al. 2014).

به‌علاوه به‌منظور بهینه‌سازی هرچه بیشتر RFN، از یک سیستم جدید برای بیان هم‌زمان دو یا چند gRNA استفاده شده است. در این سیستم آنزیم آندوریبونوکلئاز Cys-4 نیز به‌همراه مجموعه dCas9-Fok1 در سلول بیان می‌شود. همچنین محل برش این آنزیم در بالادست توالی کدکننده gRNA مورد نظر قرار داده می‌شود. به این ترتیب gRNAها تحت یک پروموتر واحد به‌صورت یک رونوشت بیان شده و سپس آنزیم Cys-4 با ایجاد برش در محل اختصاصی خود آن‌ها را از هم جدا می‌کند.

اختصاصیت سیستم CRISPR/Cas9

سیستم CRISPR/Cas9 می‌تواند برای هدف‌گیری هر ناحیه‌ای از ژنوم از طریق طراحی gRNA مطلوب به‌کار رود. اما اختصاصیت این سیستم وابسته به توالی به‌نام PAM که درست قبل از توالی هدف قرار گرفته است بستگی دارد. در سیستم ایمنی باکتریایی و آرکئی دومین شناسایی کننده ناحیه PAM در Cas9 احتمالاً به عنوان وسیله‌ای برای شناسایی DNA خودی و مهاجم به‌کار رفته و مانع از این می‌شود که CRISPR ژنوم باکتری یا آرکئی را مورد هدف قرار دهد (Addgene 2016).

توالی مورد شناسایی PAM که توسط آنزیم Cas9 شناسایی می‌شود بر اساس گونه و نوع باکتری که آنزیم نوکلئاز Cas9 از آن مشتق شده است متفاوت می‌باشد (جدول٤). آنزیم نوکلئازی Cas9 باکتری *Streptococcus pyogenes* که جزء تیپ II کریسپری می‌باشد بیش از همه به‌منظور ویرایش ژنوم استفاده شده است. این نوکلئاز خاص توالی 5′-NGG را روی DNA و در

[1] Base excision repair

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.6.9]

قسمت انتهای ′3 توالی gRNA شناسایی می‌کند. دیگر آنزیم‌های تجاری Cas9 موجود توالی‌های PAM دیگری را شناسایی می‌کنند. سیستم CRISPR/Cas9 جهش‌های پایدار و قابل توارثی را ایجاد می‌کند که به‌راحتی می‌توان از ساختار Cas9/gRNA جهت تغییرات بیشتر توسط CRISPR/Cas تمیز داد. این امر منجر به توسعه گیاهان هموزیگوت غیرتراریخته که تنها در یک نسل تولید شده اند، می‌شود (Fauser 2014; Xu et al. 2015). برخی از گونه‌ها، سلول‌ها و جنین‌های گیاهی ویرایش شده با CRISPR/Cas9 در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ٤- مواردی از کاربرد سیستم CRISPR/Cas9 در ویرایش ژنوم گونه‌ها و سلول‌ها و جنین‌های گیاهی

گیاه	منبع(ها)
Arabidopsis thaliana (Thale cress)	Eid, Ali, and Mahfouz (2016); Mao et al. (2016)
Beta vulgaris (Beet)	Ali et al. (2015a); Ji et al. (2015)
Cucumis sativus (Cucumber)	Chandrasekaran et al. (2016)
Glycine max (Soybean)	Jacobs et al. (2015); Li et al. (2015a)
Arabidopsis thaliana (Thale cress) protoplasts	Li, Zhang, and Ding (2013b); Shan et al. (2013a)
Oryza sativa (Rice) protoplasts, callus cells	Jiang et al. (2013b); Shan et al. (2013b)

جدول ٥- انواع توالی‌های PAM در سویه‌های مختلف *S. pyogenes* و سایر جنس و گونه‌های باکتریایی (Addgene 2016)

توالی اختصاصی PAM	گونه باکتریایی/ انواع پروتئین Cas9
NGG	*Streptococcus pyogenes* (SP); SpCas9
NAG	SpCas9 D1135E variant
NGCG	SpCas9 VRER variant
NGAG	SpCas9 EQR variant
NGNG یا NGAN	SpCas9 VQR variant
NNGRR(N) یا NNGRRT	*Staphylococcus aureus* (SA); SaCas9
NNNNGATT	*Neisseria meningitidis* (NM)
NNAGAAW	*Streptococcus themophilus* (ST)
NAAAAC	*Treponema denticola* (TD)
TTN	Cpf1 (از گونه‌های متنوع)
توالی PAM شناسایی نشده است	سایر پروتئین‌های Cas9s برگرفته از گونه‌های مختلف

ساخت سازه‌های ژنتیکی برای تحقیقات سیستم CRISPR/Cas در ابتدا توالی RNA راهنما (gRNA) که آلل خاصی را هدف‌گیری می‌نماید با استفاده از الگوریتم پیش‌بینی وبسایت Harvard CHOP-CHOP (http://chopchop.cbu.uib.no) طراحی می‌شود (Labun et al. 2016). انتخاب gRNA با توجه به موارد زیر انجام می‌شود: ۱- تا حد ممکن نزدیک به انتهای ′۵ باشد ۲- هر سه آلل CsFAE1 را پوشش دهد ۳- اسکور با کارایی بالا داشته باشد ٤- نواحی غیرهدف (Off target) وجود نداشته باشد ۵- حداقل نواحی خود مکمل باشد ٦- مقدار GC بالا باشد (ترجیحاً بین ٤۰ تا ۷۰٪) (Wang et al. 2014; Tsai et al. 2015). بهترین gRNA با استفاده از نرم‌افزارهای مناسب مانند نرم‌افزار تحت وب Cas-Of-Finder (http://www.rgenome.net/cas-offinder) از نظر وجود Off targetهای احتمالی ارزیابی شود (Bae et al. 2014). پس از سنتز gRNA و همسانه‌سازی آن در وکتور مناسب (مثلا با روش Golden gate) تحت پیشبر (پروموتر) مناسب و پایانبر (ترمیناتور)، قطعه نهایی در وکتور بیانی منتقل می‌شود و در نهایت کاست Cas9 حاوی پیشبر و پایانبر به وکتور بیانی اضافه می‌شود. ناقل نهایی به *Agrobacterium tumefacience* منتقل شده و برای تراریختی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

مگانوکلئازها، ZFNها، TALENها و سیستم CRISPR/Cas ابزارهای به‌روز، کارآمد و منعطفی هستند که توانایی ایجاد تغییرات اساسی ژنومی در پژوهش‌های زیستی و نیز پزشکی فردی را دارند. این فن‌آوری‌های در حال ظهور به‌طرز چشمگیری توانایی دستکاری و مطالعه‌ی ارگانیسم‌های الگو را گسترش داده، نویدبخش درمان بیماری‌های ژنتیکی شده‌اند. با وجود این فناوری‌ها، همچنان پرسش‌ها و چالش‌های مهمی برای رسیدن

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.6.9]

کامل به اهداف فوق وجود دارد. روش‌های بهینه‌سازی در تحویل این نوکلئازها به درون سلول‌ها و ارگانیسم‌ها، یکی از مهم‌ترین این چالش‌ها است. به‌ویژه در مورد TALENها که پروتئین‌های نسبتا بزرگی بوده و دارای توالی‌های تکراری پشت‌سر هم می‌باشند، تحویل کارآمد آن‌ها بسیار مشکل است. زیرا توالی‌های تکراری در همه‌ی سیستم‌های زیستی از ویروس‌ها و پروکاریوت‌ها گرفته تا یوکاریوت‌ها، طی همانندسازی DNA ناپایدارند. با این وجود، ناقل‌های آدنوویروسی تا حدودی توانایی حمل کردن و تحویل آن‌ها به سلول‌های انسانی را دارند (Holkers et al. 2013). هرچند سیستم CRISPR/Cas نوید بزرگی برای مهندسی ژنتیک به ارمغان آورده، اما مشکلات مربوط به توالی PAM، بسیاری از کاربردهای این سیستم را محدود کرده است (Gaj et al. 2013). مطالعات بیشتری برای افزایش ویژگی و کاهش سمیت سیستم CRISPR/Cas لازم است. این فن‌آوری‌ها به پژوهشگران این توانایی را می‌دهند که هر ژنومی را به دلخواه تغییر دهند و ما را در فهم بهتر سازوکار بیماری و درمان آن امیدوار کنند. سیستم کریسپر یک ابزار ویرایش ژنی جدید است که در مقایسه با سیستم‌های قبلی پتانسیل‌ها و کاربردهای بیشتری دارد. از جمله‌ی این کاربردها می‌توان به کاربرد کریسپر در شناخت بیماری‌های ژنتیکی و اپی ژنتیکی مختلف مثل سرطان اشاره کرد. بررسی سرطان توسط سیستم کریسپر به دو روش شامل خاموش کردن ژن‌های سرطان‌زا و روشن کردن ژن‌های مهارکننده تومور انجام می‌گیرد. همچنین با توجه به قابلیت دقیق کریسپر، می‌توان از این سیستم جهت ایجاد جهش‌های دقیق در رده‌های مختلف سلولی به‌منظور مدل‌سازی سرطان‌های متنوع استفاده نمود. اینگونه مدل‌سازی‌ها به شناسایی بهتر سرطان و توانایی تولید داروهای مؤثر می‌انجامد (Noori-Daloii et al. 2014). مقایسه بین چهار اندونوکلئاز مهندسی شده‌ی جایگاه اختصاصی محل در جدول ۵ ذکر شده است.

جدول ٦- مقایسه بین چهار اندونوکلئاز مهندسی شده‌ی جایگاه اختصاصی هدف (Noori-Daloii et al. 2014).

ابزار	Meganucleases	ZFN	TALEN	Cas9
طول جایگاه شناسایی	٤٠- ١٤ جفت‌باز	٢٨- ١٨ جفت‌باز و فاصله انداز ٧- ٥جفت‌باز	٥٠- ٣٠ جفت‌باز و فاصله انداز ٣٠- ١٠ جفت‌باز	٢٠جفت‌باز + PAM (٥- ٢)
Modularity	کم	متوسط	زیاد	ندارد
مزایا	١- عدم نیاز به قلمروی برش‌دهنده DNA از Fok1 ٢- کارایی بالای برش DNA	١- طراحی در ویژگی برای سوبسترا نسبتاً آسان هست ٢- ویژگی، تمایل اتصال و سمیت شناخته شده دارند	١- طراحی در ویژگی برای سوبسترا آسان هست ٢- طول جایگاه شناسایی به دلخواه تنظیم می‌شود.	١- به صرفه‌تر بودن ساخت آن از لحاظ زمان و هزینه ٢- توانایی هدف قرار دادن چند لوکوس به‌طور همزمان ٣- الگوهای برش متنوع
معایب	١- طراحی در ویژگی برای سوبسترا مشکل هست ٢- ویژگی و سمیت به‌طور سیستماتیک تعیین نشده است	١- ترجیح توالی‌های غنی از گوانین ٢- ایجاد برش‌های خارج از جایگاه هدف و سمیت ناشی از آن	١- کد اختصاصی برای شناسایی گوانین ندارد ٢- ویژگی و سمیت به‌طور سیستماتیک تعیین نشده است ٣- اندازه بزرگ پروتئین ممکن است تحویل آن را با مشکل روبه‌رو کند.	١- ایجاد برش‌های خارج از جایگاه هدف

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.6.9]

منابع

Addgene (2016) CRISPR 101: A desktop resource, 1st edition, Chapter 2: what is CRISPR? p. 19. New York, USA.

Ainley W M, Sastry-Dent L, Welter M E, Murray M G, Zeitler B, Amora R, & Simpson M A (2013) Trait stacking via targeted genome editing. Plant Biotechnology Journal 11: 1126-1134.

Ali Z, Abulfaraj A, Idris A, Ali S, Tashkandi M, & Mahfouz M M (2015) CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. Genome biology 16: 238.

Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M (2014) Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. Nature 513: 569-573.

Antunes M S, Smith J J, Jentz D and Medford J I (2012) Targeted DNA excision in Arabidopsis by a re-engineered homing endonuclease. BMC Biotechnology 12:86-98.

Arnould S, Chames P, Perez C, Lacroix E, Duclert A, Epinat JC, Stricher F, Petit AS, Patin A, Guillier S, et al (2006) Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets. Journal of Molecular Biology 355: 443-458.

Asadollahi K, Abdollahzadeh R, Nouri Delavi M (2014) Targeted editing of genomes mediated by engineered nucleases; a new approach to gene therapy. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences 21: 131-144. (In Farsi).

Bibikova M, GolicM, Golic KG, Carroll D (2002) Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in Drosophila using zinc-finger nucleases. Genetics 161: 1169-1175.

Bitinaite J, Wah DA, Aggarwal AK, Schildkraut I (1998) FokI dimerization is required for DNA cleavage. Proc Natl Acad Sci USA 95: 10570-5.

Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. Science 326: 1509-1512.

Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, et al (2008) Small CRISPR RNAs guideantiviral defense in prokaryotes. Science 321: 960-964.

Budhagatapalli N, Rutten T, Gurushidze M, Kumlehn J, & Hensel G (2015) Targeted modification of gene function exploiting homology-directed repair of TALEN-mediated double-strand breaks in barley. G3: Genes, Genomes, Genetics 5: 1857-1863.

Cai C Q, Doyon Y, Ainley W M, Miller J C, DeKelver R C, Moehle E A, Blue R (2009) Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases. Plant molecular biology 69: 699-709.

Carbery ID, JiD, Harrington A, Brown V, Weinstein EJ, Lia (2010) Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. Genetics 186: 451-459.

Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman M, Gal-On A (2016) Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. Molecular plant pathology 17: 1140-1153.

Chen K, Gao C (2014) Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements. Plant Cell Reports 33: 575-83.

Clasen B M, Stoddard T J, Luo S, Demorest Z L, Li J, Cedrone F, Coffman A (2016) Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. Plant biotechnology journal 14: 169-176.

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339: 819-823.

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339: 819-823.

Cui X, JiD, Fisher DA, Wu Y, Briner DM, Weinstein EJ (2011) Targeted integration in ratand mouse embryos with zinc-finger nucleases. Nature Biotechnology 29: 64-67.

Curtin S J, Zhang F, Sander J D, Haun W J, Starker C, Baltes N J, & Dobbs D (2011) Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases. Plant Physiology 156: 466-473.

De Pater S, Neuteboom L W, Pinas J E, Hooykaas P J, & Van Der Zaal B J (2009) ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in Arabidopsis through Agrobacterium-mediated floral dip transformation. Plant biotechnology journal 7: 821-835.

Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, Zhu JK, Shi Y, Yan N (2012) Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. Science 335: 720-723.

Deveau H, BarrangouR, Garneau JE, Labonte J, Fremaux C, et al (2008) Phage response to CRISPRencoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. Journal of Bacteriology 190: 1390-400.

Ding Q, Lee YK, Schaefer EA, Peters DT, Veres A, Kim K, Kuperwasser N, Motola DL, Meissner TB, Hendriks WT, et al (2013) A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. Cell Stem Cell 12: 238-251.

Doudna JA, Charpentier E (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science 346: 1258096.

Doyon Y, Vo TD, Mendel MC, Greenberg SG, Wang J, Xia DF, Miller JC, Urnov FD, Gregory PD, Holmes MC (2011) Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. Nature Methods 8: 74-79.

Duan X, Gimble FS, Quiocho FA (1997) Crystal structure of PI-SceI, a homing endonuclease with protein splicing activity. Cell 89: 555-564.

Dumbliauskas E, Lechner E, Jaciubek M, Berr A, Pazhouhandeh M, Alioua M, ... Molinier J (2011) The Arabidopsis CUL4–DDB1 complex interacts with MSI1 and is required to maintain MEDEA parental imprinting. The European Molecular Biology Organization journal 30: 731-743.

Eid A, Ali Z, Mahfouz M M (2016) High efficiency of targeted mutagenesis in Arabidopsis via meiotic promoter-

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.6.9]

driven expression of Cas9 endonuclease. Plant cell reports 35: 1555-1558.
Fauser F, Schiml S, Puchta H (2014) Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 79: 348-359.
Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends in Biotechnology 31: 397-405.
Gao H, Smith J, Yang M, Jones S, Djukanovic V, Nicholson M G, & Lyznik L A (2010) Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. The Plant Journal 61: 176-187.
Gasiunas G, BarrangouR, Horvath P, Siksnys V (2012) Cas9–crRNA ribonucleoprotein complexmediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America 109: 2579-2586.
Geurts AM, Moreno C (2010) Zinc-finger nucleases: new strategies to target the rat genome. Clinical Science 119: 303-311.
Gogarten JP, Hilario E (2006) Inteins, introns, and homing endonucleases: recent revelations about the life cycle of parasitic genetic elements. BMC Evolutionary Biology 6: 94.
Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C (2007) CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. Nucleic Acids Research 35(suppl 2): W52-W57.
Guo J, Gaj T, Barbas CF III (2010) Directed evolution of an enhanced and highly efficient FokI cleavage domain for zinc finger nucleases. Journal of Molecular Biology 400: 96-107.
Händel EM, Alwin S, Cathomen T (2009) Expanding or restricting the target site repertoire of zinc-finger nucleases: the inter-domain linker as a major determinant of target site selectivity. Molecular Therapy 17: 104-111.
Haun W, Coffman A, Clasen B M, Demorest Z L, Lowy A, Ray E, & Mathis L (2014) Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. Plant biotechnology journal 12: 934-940.
Heath PJ, Stephens KM, Monnat RJ Jr, Stoddard BL (1997) The structure of I-CreI, a group I intron-encoded homing endonuclease. Nature Structural and Molecular Biology 4: 468-476.
Holkers M, Maggio I, Liu J, Janssen JM, Miselli F, Mussolino C, Recchia A, Cathomen T, Gonçalves MA (2013) Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. Nucleic Acids Research 41: e63.
Holt N, WangJ, Kim K, Friedman G, Wang X, Taupin V et al (2010) Human hematopoietic stem/ progenitor cells modified by zinc- finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo. Nature Biotechnology 28: 839-847.
Hsu PD, Lander ES, Zhang F (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell 157: 1262-1278.
Huo Y, Nam KH, Ding F, Lee H, Wu L, Xiao Y, Farchione MD Jr, Zhou S, Rajashankar K, Kurinov I, Zhang R, Ke A (2014) Structures of CRISPR Cas3 offer mechanistic insights into Cascade-activated DNA unwinding and degradation. Nature Structural and Molecular Biology 21: 771-777.
Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A (1987) Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. Journal of Bacteriology 169: 5429-5433.
Jacobs T B, LaFayette P R, Schmitz R J, & Parrott W A (2015) Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. BMC biotechnology 15: 16.
Jensen NM., Dalsgaard T, Jakobsen M, Nielsen RR, Sorensen CB, Bolund L, Jensen TG (2011) An update on targeted gene repair in mammalian cells: methods and mechanisms. Journal of Biomedical Science 18: 10.
Jiang L, Qian D, Zheng H, Meng L Y, Chen J, Le W J, and Li Y (2012) RNA-dependent RNA polymerase 6 of rice (Oryza sativa) plays role in host defense against negative-strand RNA virus, Rice stripe virus. Virus research 163: 512-519.
Jiang W H, Zhou H Bi, M Fromm B Yang and D P Weeks (2013) Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. Nucleic Acids Research 41: e188.
Jiang W, BicardD, Cox D, Zhang F, Marraffini LA (20130 RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nature Biotechnology 31: 233-239.
Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nature Biotechnology 31: 233-239.
Jiang W, Marraffini LA (2015) CRISPR-Cas: New Tools for Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems. The Annual Review of Microbiology 69: 209-228.
Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337: 816-821.
Jinek M, ChylinskiK, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337: 816-821.
Joung JK, Sander JD (2013) TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. Nature Reviews Molecular Cell Biology 14: 49-55.
Jouzani SG, Tohidfar M (2013) Plant Molecular Farming: Future Prospects and Biosafety Challenges. Biosafety 2: 2.
Jouzani SG, Tohidfar M, Sadeghi A (2010) Biosafety aspects of genetically modified plants. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Tehran, Iran (In Farsi).
Khatodia S, Bhatotia K, Passricha N, Khurana SM, Tuteja N (2016) The CRISPR/Cas genome-editing tool: application in improvement of crops. Frontiers in Plant Science 7: 506.
Kim H, Kim JS (2014) A guide to genome engineering with programmable nucleases. Nature Reviews Genetics 15: 321-334.
Kumar P, and D R Jain (2015) Cγ-Aminopropylene peptide nucleic acid (amp-PNA): Chiral cationic PNAs

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.6.9]

Marton I, Zuker A, Shklarman E, Zeevi V, Tovkach A, Roffe S, Vainstein A (2010) Nontransgenic genome modification in plant cells. Plant physiology 154: 1079-1087.
Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL (2015) Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. Nature Biotechnology 33: 538-542
Meng X, Noyes MB, Zhu LJ, Lawson ND, Wolfe SA (2008) Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. Nature Biotechnology 26: 695-701.
Meyer M, Angelis MD, Wurst W, Kuhn R, Miller JC, Tan S, Qiao (2010) Genetargeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences 107: 15022-6.
Miglani GS (2017) Genome editing in crop improvement: Present scenario and future prospects. Journal of Crop Improvement 31: 453-559.
Miller J, McLachlan AD, Klug A (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus oocytes. The EMBO Journal 4: 1609-1614.
Miller JC, Holmes MC, Wang J, Guschin DY, Lee YL, Rupniewski I, Beausejour CM, Waite AJ, Wang NS, Kim KA, et al (2007) An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. Nature Biotechnology 25: 778-785.
Mojica FJ, DíezVillaseñor C, Soria E, Juez G (2000) Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. Molecular Microbiology 36: 244-246.
Morbitzer R, Römer P, Boch J, and Lahaye T (2010) Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. Proceedings of the National Academy of Sciences 107: 21617-21622.
Moscou MJ, Bogdanove AJ (2009) A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science 326: 1501.
Muñoz IG, Prieto J, Subramanian S, Coloma J, Redondo P, Villate M, Merino N, Mrenchino M, D'Abramo M, Gervasio S, et al (2011) Molecular basis of engineered meganuclease targeting of the endogenous human RAG1 locus. Nucleic Acids Research 39: 729-743
Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O (2014) Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. Cell 156: 935-949.
Nishizawa-Yokoi A, Cermak T, Hoshino T, Sugimoto K, Saika H, Mori A, & Voytas D F (2016) A defect in DNA Ligase4 enhances the frequency of TALEN-mediated targeted mutagenesis in rice. Plant physiology 170: 653-666.
Noori- Daloii MR (2010) Medical Molecular Genetics in the third millennium. Tehran: Samer; Nashre Akhar.
Noori-Daloii M, Abdollahzadeh R, Asadollahi K (2014) Targeted genome editing with engineered nucleases- A with superior PNA: DNA/RNA duplex stability and cellular uptake. Tetrahedron 71:3378-84.
Kumar V, Jain M (2014) The CRISPR–Cas system for plant genome editing: advances and opportunities. Journal of Experimental Botany 66: 47-57.
Li Z, Liu Z B, Xing A, Moon B P, Koellhoffer J P, Huang L, Cigan A M (2015) Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. Plant physiology 169(2): 960-970.
Li, J, Stoddard, T J, Demorest, Z L, Lavoie, P O, Luo, S, Clasen, B M, and Yabandith, A (2016) Multiplexed, targeted gene editing in Nicotiana benthamiana for glyco-engineering and monoclonal antibody production Plant biotechnology journal 14: 533-542
Li, J-F, B Zhang, and W Ding (2013) Efficient genome editing in plants using a CRISPR/ Cas system Cell Research 23:1229-32
Liang Z, Zhang K, Chen K, & Gao C (2014) Targeted mutagenesis in Zea mays using TALENs and the CRISPR/Cas system. Journal of Genetics and Genomics 41: 63-68.
Liu W, Yuan JS, Stewart CN Jr (2013) Advanced genetic tools for plant biotechnology. Nature Reviews Genetics 14: 781-93.
Lloyd A, Plaisier C L, Carroll D, & Drews G N (2005) Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences 102: 2232-2237.
Mak ANS, Bradley P, Cernadas RA, Bogdanove AJ, Stoddard BL (2012) The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. Science 335: 716-719.
Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, et al (2013) CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. Nature Biotechnology 31: 833-838.
Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, Yang L. Church GM (2013) CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. Nature Biotechnology 31: 833-838.
Manica A, Zebec Z, Steinkellner J, Schleper C (2013) Unexpectedly broad target recognition of the CRISPR-mediated virus defence system in the archaeon Sulfolobus solfataricus. Nucleic Acids Research 41: 10509–10517.
Mao Y, Zhang Z, Feng Z, Wei P, Zhang H, Botella J R, & Zhu J K (2016) Development of germ-line-specific CRISPR-Cas9 systems to improve the production of heritable gene modifications in Arabidopsis. Plant biotechnology journal 14: 519-532.
Marcaida MJ, Muñoz IG, Blanco FJ, Prieto J, Montoya G (2010) Homing endonucleases: from basics to therapeutic applications. Cellular and Molecular Life Sciences 67: 727-748.
Marraffini LA, Jiang W (2015) CRISPR-Cas: New Tools for Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems. Annual Review of Microbiology 69: 209-228.
Marraffini LA, Jiang W (2015) CRISPR-Cas: New Tools for Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems. Annual Review Microbiology 69: 209-228.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.6.9]

new approach in gene therapy. Quarterly Journal of Sabzevar University of Medical Sciences 21: 131-144.
Osakabe K, Osakabe Y, & Toki S (2010) Site-directed mutagenesis in Arabidopsis using custom-designed zinc finger nucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences 107: 12034-12039.
Pakbaz S, Pazhouhandeh M, & Eini Gandomani, O (2015) A method for Evaluation of RNA Silencing Suppression Activity in Plants Using Two Proteins of Grapevine Fanleaf Virus (GFLV). Genetic Engineering and Biosafety Journal 4: 135-144.
Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR (2011) Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. Nature Methods 8: 765-70.
Pauwels K, Podevin N, Breyer D, Carroll D, Herman P (2014) Engineering nucleases for gene targeting: safety and regulatory considerations. New Biotechnology 31: 18-27.
Pazhouhandeh M, Dieterle M, Marrocco K, Lechner E, Berry B, Brault V, ... & Ziegler-Graff V (2006) F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. Proceedings of the National Academy of Sciences 103: 1994-1999.
Peer R, Rivlin G, Golobovitch S, Lapidot M, Gal-On A, Vainstein A, & Flaishman M A (2015) Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in perennial fruit trees. Planta 241: 941-951.
Perez-Pinera P, Ousterout DG, Gersbach CA (2012) Advances in targeted genome editing. Current Opinion in Chemical Biology 16: 268-277.
Petolino J F, Worden A, Curlee K, Connell J, Moynahan T L S, Larsen C, & Russell, S (2010) Zinc finger nuclease-mediated transgene deletion. Plant molecular biology 73: 617-628.
Popplewell L, Koo T, Leclerc X, Mamchaoui K, Gouble A, Mouly V, Voit T, Pagues F, Cedrone F, et al (2013) Gene correction of a Duchenne muscular dystrophy mutation by meganuclease-enhanced exon knock-in. Human Gene Therapy 24: 692-701.
Puchta H (1999) Use of I-Sce I to induce DNA double-strand breaks in Nicotiana in DNA Repair Protocols. Humana Press (pp 447-451).
Puchta H (2002) Gene replacement by homologous recombination in plants. Plant Molecular Biology 48:173-82.
Puchta H, Dujon B, & Hohn B (1993) Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. Nucleic acids research 21: 5034-5040.
Puchta H, Dujon B, & Hohn B (1996) Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. Proceedings of the National Academy of Sciences 93: 5055-5060.
Ramirez CL, Foley JE, Wright DA, Müller-Lerch F, Rahman SH, Cornu TI, Winfrey RJ, Sander JD, Fu F, Townsend JA, et al (2008) Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. Nature Methods 5: 374-5.
Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell 154: 1380-1389.
Redondo P, Prieto J, Muñoz IG, Alibés A, Stricher F, Serrano L, Cabaniols JP, Daboussi F, Arnould S, Perez C, et al (2008) Molecular basis of xeroderma pigmentosum group C DNA recognition by engineered meganucleases. Nature 456: 107-111.
Rollie C, Schneider S, Brinkmann AS, Bolt EL, White MF (2015) Intrinsic sequence specificity of the Cas1 integrase directs new spacer acquisition. Elife 4: e08716.
Rosen LE, Morrison HA, Masri S, Brown MJ, Springstubb, Sussman D, Stoddard BL, Seligman LM (2006) Homing endonuclease I-CreI derivatives with novel DNA target specificities. Nucleic Acids Research 34: 4791-4800.
Samanta M, Dey A, Gayen S (2016) CRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes. Transgenic Research. 25: 561-573
Sander J D, Dahlborg E J, Goodwin M J, Cade L, Zhang F, Cifuentes D, & Pierick C J (2011) Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). Nature methods 8: 67-69.
Sawai S, Ohyama K, Yasumoto S, Seki H, Sakuma T, Yamamoto T, Muranaka T (2014) Sterol side chain reductase 2 is a key enzyme in the biosynthesis of cholesterol, the common precursor of toxic steroidal glycoalkaloids in potato. The Plant Cell 26: 3763-3774.
Schneider K, Schiermeyer A, Dolls A, Koch N, Herwartz D, Kirchhoff J, Sastry-Dent L (2016) Targeted gene exchange in plant cells mediated by a zinc finger nuclease double cut. Plant biotechnology journal 14: 1151-1160.
Seligman LM, Chisholm KM, Chevalier BS, Chadsey MS, Edwards ST, Savage JH, Veillet AL (2002) Mutations altering the cleavage specificity of a homing endonuclease. Nucleic Acids Research 30: 3870-3879.
Shan Q, Wang Y, Chen K, Liang Z, Li J, Zhang Y, & Zhang Y (2013) Rapid and efficient gene modification in rice and Brachypodium using TALENs. Molecular plant 6: 1365-1368.
Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, & Gao C (2013) Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. Nature biotechnology 31: 686-688.
Shan Q, Zhang Y, Chen K, Zhang K, Gao C (2015) Creation of fragrant rice by targeted knockout of the Os BADH 2 gene using TALEN technology. Plant biotechnology journal 13: 791-800.
Shimizu Y, Bhakta MS, Segal DJ (2009) Restricted spacer tolerance of a zinc finger nuclease with a six amino acid linker. Bioorg Med Chem Lett 19: 3970-3972.
Smith HQ and Nathans D (1973) A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. Journal of Molecular Biology 81: 419-423.
Smith J, Grizot S, Arnould S, Duclert A, Epinat JC, Chames P, Prieto J, Redondo P, Blanco FJ, Bravo J, et al (2006) A combinatorial approach to create artificial

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.6.9]

homing endonucleases cleaving chosen sequences. Nucleic Acids Research 34: e149.
Staals RH, Agari Y, Maki-Yonekura S, Zhu Y, Taylor DW, van Duijn E, Barendregt A, Vlot M, Koehorst JJ, Sakamoto K, Masuda A, et al (2013) Structure and activity of the RNA-targeting Type III-B CRISPR-Cas complex of Thermus thermophillus. Molecuar Cell 52: 135-145.
Sternberg SH, ReddingS, Jinek M, Greene EC, Doudna JA (2014) DNA interrogation by theCRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. Nature 507: 62–67.
Sun N, Zhao H. 2013. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): A highly efficient and versatile tool for genome editing. Biotechnology Bioengineering. 110: 1811-1821.
Szczelkun MD, TikhomirovaM, Sinkunas T, Gasiunas G, Karvelis T, et al. 2014. Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America. 111: 9798-9803.
Tohidfar M, Maleki N, Abedini R (2009) Environmental risks of GM plants and the resistance management. Biosafety Journal 2: 24-36. (In Farsi).
Townsend J A, Wright D A, Winfrey R J, Fu F, Maeder M L, Joung J K, & Voytas D F (2009) High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. Nature 459: 442-445.
Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, et al (2014) Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. Nature Biotechnology 32: 569-576.
Urnov, FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD (2010) Genome editing with engineered zinc finger nucleases. Nature Reviews Genetics 11: 636-646.
Valton J, Daboussi F, Leduc S, Molina R, Redondo P, Macmaster R, Montoya G, Duchateau P (2012) 5′-Cytosine-phosphoguanine (CpG) methylation impacts the activity of natural and engineered meganucleases. The Journal of Biological Chemistry 287: 30139-30150.
Vanamee ES, Santagata S, Aggarwal AK (2001) FokI requires two specific DNA sites for cleavage. Journal of Molecular Biology 309: 69-78.
Watanabe K, Breier U, Hensel G, Kumlehn J, Schubert I, and Reiss B (2016) Stable gene replacement in barley by targeted double-strand break induction. Journal of experimental botany 67: 1433-1445.
Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA (2012) RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. Nature 482: 331-338.
Wolfe SA, Nekludova L, Pabo CO (2000) DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. Annual Review Biophysics 3: 183-212.
Wright D A, Townsend J A, Winfrey Jr R J, Irwin P A, Rajagopal J, Lonosky P M, Voytas D F (2005) High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. The Plant Journal 44: 693-705.
Xu RF, Li H, Qin RY, Li J, Qiu CH, Yang YC, Ma H, Li L, Wei PC, Yang JB (2015) Generation of inheritable and "transgene clean" targeted genome-modified rice in later generations using the CRISPR/Cas9 system. Scientific Reports 5: 11491.
Yang M, Djukanovic V, Stagg J, Lenderts B, Bidney D, Falco S C, Lyznik L A (2009) Targeted mutagenesis in the progeny of maize transgenic plants. Plant molecular biology 70: 669-679.
Zhang F, Maeder M L, Unger-Wallace E, Hoshaw J P, Reyon D, Christian M, Joung JK (2010) High frequency targeted mutagenesis in Arabidopsis thaliana using zinc finger nucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences 107: 12028-12033.
Zhang J, Kasciukovic T, White MF (2012) The CRISPR associated protein Cas4 Is a 5′ to 3′ DNA exonuclease with an iron-sulfur cluster. PLoS One 7: e47232.
Zhang L, Zhou Q (2014) CRISPR/Cas technology: a revolutionary approach for genome engineering. Science China Life Sciences 57: 639-640.
Zhang Y, Zhang F, Li X, Baller J A, Qi Y, Starker C G, & Voytas D F (2013) Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. Plant physiology 161: 20-27.
Zhao L, Bonocora RP, Shub DA, Stoddard BL (2007) The restriction fold turns to the dark side: a bacterial homing endonuclease with a PD-(D/E) -XK motif. The European Molecular Biology Organization Journal 26: 2432-2442.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.6.9]